



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Culturas de células na presença de um inibidor da respiração mitocondrial

Patrícia Alexandra Rocha da Silva

Mestrado Integrado em Medicina Dentária
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Orientador: Professora Doutora Helena Fernandes
Coorientador: Professor Doutor António Silvério Cabrita

Coimbra, Julho de 2016

Culturas de células na presença de um inibidor da respiração mitocondrial

Silva, P. ^{1*}; Fernandes, H. ²; Cabrita, A. S. ³

¹ Aluna do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

² Professora Catedrática do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

³ Professor Doutor auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Área da Medicina Dentária, FMUC, Coimbra, Portugal

Avenida Bissaya Barreto, Bloco de Celas

3000-075 Coimbra

Portugal

Tel: +351239484183

Fax: +351239402910

*e-mail do autor: patriciarochasilva77@gmail.com

Índice geral

Índice de Figuras.....	v
Índice de Tabelas.....	v
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Introdução.....	1
Objetivo.....	9
Materiais e Métodos.....	10
Resultados.....	12
Discussão.....	14
Conclusão.....	15
Agradecimentos.....	16
Bibliografia.....	17

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática das diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (Efeito de Warburg) (2).....	3
Figura 2: Viabilidade/proliferação celular avaliada pelo ensaio do MTT. Análise qualitativa...	12
Figura 3: Viabilidade/proliferação celular avaliada pelo ensaio do MTT. Análise quantitativa..	13

Índice de Tabelas

Tabela I: Média e Desvio Padrão obtidos no dia 1 para as concentrações 10, 25, 50 e 100 µg/mL de Na ₂ S.....	12
Tabela II: Média e Desvio Padrão obtidos no dia 4 para as concentrações 10, 25, 50 e 100 µg/mL de Na ₂ S.....	13

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ATP – Adenosina 5'-trifosfato

CO₂ – Dióxido de Carbono

TCA – Ciclo do ácido tricarboxílico

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

ADP – Adenosina 5'-difosfato

Acetil-CoA – Acetil-coenzima A

FDG-PET – (¹⁸F) - fluorodeoxiglucose

H₂S – Sulfureto de Hidrogénio

CBS – Cistationa β - sintase

CSE – Cistationa γ - liase

3-MST – Sulfurtransferase 3 - mercaptopyruvate

CAT – Cisteína aminotransferase

SQR – Sulfureto quinona redutase

NO – Óxido nítrico

CO – Monóxido de Carbono

K_{ATP} – Canais de potássio sensíveis ao ATP

SNC – Sistema Nervoso Central

H⁺ - Ião Hidrogénio

O₂ – Oxigénio

Na₂S – Sulfureto de Sódio

Resumo

Introdução: Tumorigénese está dependente da reprogramação do metabolismo celular como consequência de mutações oncogénicas. Uma característica comum do metabolismo das células tumorais é a metabolização da glucose de um modo distinto das células de tecidos normais, onde as células cancerígenas "fermentam" a glucose em lactato, mesmo na presença de oxigénio. Este efeito é referido como efeito de Warbug. O sulfureto de hidrogénio (H₂S) é um composto capaz de alterar o metabolismo celular. H₂S era reconhecido apenas como um gás com risco ambiental, no entanto este é também sintetizado endogenamente por tecidos de mamíferos. Foi demonstrado que a exposição de murganhos ao gás de H₂S resultou numa diminuição da temperatura corporal, assim como uma redução da taxa metabólica, o que foi designado de *suspended animation-like state*. **Objetivo:** Este estudo tem como objetivo verificar se o composto Na₂S (molécula dadora de H₂S) apresenta citotoxicidade a nível da viabilidade celular, quando aplicado em culturas de células numa gama de concentrações de 10 a 100 µg/mL. **Materiais e Métodos:** Foi utilizada a linha celular osteoblástica MG63. As células foram cultivadas em *α-Minimal Essential Medium Eagle* (α-MEM, Gibco). Mais tarde, as células foram semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 10⁴ cells/cm², e cultivadas durante 24h para permitir a adesão celular. De seguida, o meio de cultura foi descartado e substituído por um meio de cultura contendo o composto Na₂S nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/mL. As culturas foram mantidas por mais 1 e 4 dias, e caracterizadas relativamente à viabilidade/proliferação celular através do ensaio do MTT. **Resultados:** A viabilidade/proliferação celular foi avaliada em culturas efetuadas na presença do composto Na₂S após 1 e 4 dias de exposição. As células proliferam ao longo do tempo de cultura, apresentando uma elevada taxa de crescimento. Verificou-se que o composto Na₂S não apresentou citotoxicidade a nível da viabilidade celular e o comportamento celular foi semelhante ao observado nas culturas controlo. **Conclusão:** De acordo com o estudo efetuado, concluiu-se que para a gama de concentrações utilizada, o composto Na₂S não apresenta citotoxicidade. Em trabalhos futuros seria interessante testar este composto noutras culturas celulares e noutra gama de concentrações assim como perceber se este tem capacidade para reduzir o metabolismo celular, permitindo uma futura aplicação terapêutica. **Palavras-chave:** Metabolismo celular, células tumorais, H₂S, citotoxicidade, viabilidade/proliferação celular

Abstract

Introduction: Tumorigenesis is dependent on the reprogramming of cellular metabolism as consequence of oncogenic mutations. A common feature of cancer cell metabolism is the metabolization of glucose in a different way of normal cells, in which cancer cells "ferment" glucose to lactate, even in the presence of oxygen. This effect is currently stated as the Warburg effect. Hydrogen sulfide (H₂S) is a compound capable of altering cellular metabolism. H₂S was recognized only as a gas with environmental risk, however it is also synthesized from mammalian tissue. It was shown that the mice exposure to H₂S gas resulted in a decrease of body temperature and in a reduction in metabolic rate, this was called *suspended animation-like state*. **Objective:** This study aims to determine if the Na₂S compound (donor molecule of H₂S) shows cytotoxicity related to cell viability when applied to cell cultures at a concentration ranging from 10 to 100 µg/mL. **Materials and Methods:** To test this, was used the osteoblastic cell line MG63. The cells were in supplemented cultured in a-Minimal Essential Medium Eagle (a-MEM, Gibco). Cells were further seeded in 96 wells at a density of 10⁴cells/cm² and cultured for 24 hours to allow cell adherence. Then, the culture medium was discarded and replaced with a medium of culture containing the compound Na₂S with concentrations of 10, 25, 50 and 100 µg/mL. Cultures were maintained for 1 to 4 days, and characterized with regard to the viability/proliferation using the MTT assay. **Results:** Viability/proliferation was assessed in cultures exposed to Na₂S compound after 1 and 4 days exposure. The cells proliferate during the culture time, with a pattern of high growth rate. It was found that the compound Na₂S showed no cytotoxicity related to the cell viability and the cell behavior was similar to that observed in control cultures. **Conclusion:** According to the study conducted, it was concluded that for the range of concentrations used (10 to 100 µg / ml), the Na₂S compound shows no cytotoxicity. In future work, would be interesting to test this compound in other cell cultures and in another concentration range as well as see if it is able to reduce cellular metabolism, allowing for future therapeutic application. **Keywords:** cell metabolism, cancer cells, H₂S, cytotoxicity, cell viability/proliferation

Introdução

O metabolismo celular é um processo complexo que integra reações químicas, nomeadamente catabólicas e anabólicas, catalisadas por enzimas num organismo vivo, de forma coordenada e dinâmica (1). As reações anabólicas referem-se à síntese de moléculas grandes e complexas a partir de precursores mais simples, implicando o gasto de energia e as reações catabólicas referem-se à degradação de moléculas complexas em moléculas mais simples, com libertação de energia.

Pelo nosso conhecimento estas duas reações estão na base do funcionamento das células e dos tecidos, mostrando grandes variações consoante os tecidos considerados (1).

A visão clássica do metabolismo é o de um sistema homeostático onde um conjunto de enzimas permitem que a célula responda às novas exigências bioenergéticas. No entanto, a evidência aponta para um sistema regulado de forma dinâmica que é programado para ajustar as condições para a proliferação das células ou satisfazer as necessidades específicas de cada tecido diferenciado, conforme apropriado (2).

Existem ainda variações do metabolismo celular de acordo com o estado de saúde em geral e em particular com o estado de saúde das células e tecidos, como é o caso das neoplasias. Um grande número de estudos mostram que em muitas lesões neoplásicas se observa uma grande variação quantitativa e/ou qualitativa das enzimas dos tecidos, o que vai condicionar a atividade metabólica (3-5).

Em organismos multicelulares, a maioria das células são expostas a um fornecimento constante de nutrientes e a sobrevivência do organismo necessita de sistemas de controlo que impeçam a proliferação de células individuais anormais quando a disponibilidade de nutrientes excede os níveis necessários para permitir a divisão celular. A proliferação descontrolada é impedida porque as células normalmente não consomem os nutrientes do seu ambiente a não ser que sejam estimuladas para o fazer através de fatores de crescimento, como se pode verificar no embrião em desenvolvimento ou durante uma resposta imune no adulto, onde as células utilizam os nutrientes para proliferarem a partir de sinais de fatores de crescimento (2). No entanto, as células neoplásicas ultrapassam esta dependência pelo fator de crescimento através da aquisição de mutações genéticas que alteram funcionalmente as vias de sinalização iniciadas pelos recetores, permitindo assim a sua proliferação (2, 4-8).

Muitas vias importantes de sinalização oncogénicas convergem para adaptar o metabolismo das células neoplásicas, dando às células a capacidade para adquirir nutrientes e regular coordenadamente as vias metabólicas de forma a permitir o seu crescimento e sobrevivência (2, 4, 6, 8-10). Além disso, algumas destas alterações metabólicas parecem ser absolutamente necessárias para a transformação maligna (6, 8, 9). Assim, propõe-se que a

reprogramação do metabolismo celular deve ser considerado uma característica fundamental do cancro (2, 9, 11).

Mecanismos moleculares múltiplos, tanto intrínsecos como extrínsecos podem alterar o metabolismo celular e fornecer o suporte para as três necessidades básicas de células em divisão, nomeadamente a produção rápida de adenosina 5'-trifosfato (ATP) de forma a manter o estado de energia, aumento da biossíntese de macromoléculas e manutenção do estado redox celular apropriado (9).

Para atender a essas necessidades, as células neoplásicas adquirem alterações no metabolismo das quatro principais classes de macromoléculas: hidratos de carbono, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. Muitas alterações semelhantes são também observadas em células normais de proliferação rápida, que representam as respostas apropriadas para os sinais de crescimento (3, 9).

A relação entre o cancro e alteração do metabolismo não é algo novo, pois muitas observações feitas durante o período inicial da investigação da biologia do cancro identificaram alterações metabólicas como uma característica comum dos tecidos tumorais, como é o caso do efeito Warburg (9).

O efeito de Warburg foi descrito pela primeira vez por Otto Warburg, em 1924, que observou que as células tumorais metabolizam a glucose de um modo distinto das células de tecidos normais e descobriu que ao contrário da maioria dos tecidos normais, as células cancerígenas "fermentam" a glucose em lactato, através da fermentação láctica, mesmo na presença de oxigénio suficiente para permitir a fosforilação oxidativa mitocondrial (1-14). A explicação definitiva para a observação de Warburg permaneceu uma incógnita, pelo menos em parte, uma vez que as necessidades de energia para a proliferação celular parecem à primeira vista ser melhor atendidas através do catabolismo completo da glucose usando a fosforilação oxidativa mitocondrial para maximizar a produção de ATP (2, 7, 8, 10).

Os tecidos diferenciados não proliferativos, na presença de oxigénio metabolizam a glucose em piruvato via glicólise, que ocorre no citoplasma de todas as células, seguido de oxidação completa do piruvato em CO₂ no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou ciclo de krebs, que ocorre na matriz mitocondrial (1-3). Esta reação origina grandes quantidades de NADH, e os eletrões transportados por este são em seguida usados na fosforilação oxidativa para maximizar a produção de ATP, com uma produção mínima de lactato (2, 3, 12). O oxigénio é essencial para este processo uma vez que atua como aceitador final, sendo convertido em água (2).

Por outro lado, quando o oxigénio é limitado as células diferenciadas podem redirecionar o piruvato formado pela glicólise para a fermentação láctica, convertendo-o em lactato (glicólise anaeróbica) (1-3). Esta produção de lactato durante a glicólise anaeróbica vai

permitir a continuação da glicólise, contudo é menos eficiente resultando numa produção de ATP mínima (~2 ATP) quando comparada com a fosforilação oxidativa (~36 ATP) (1, 2, 9).

Em contraste, a maioria das células tumorais produzem grandes quantidades de lactato, independentemente da disponibilidade de oxigénio e, por isso, o seu metabolismo é muitas vezes referido como "glicólise aeróbica" (2, 3, 5, 8, 9, 11-13). (Figura 1) Esta propriedade é compartilhada pelos tecidos proliferativos normais (2, 9).

Inicialmente, Warburg colocou a hipótese de que as células tumorais desenvolvem um defeito nas mitocôndrias, o que origina conseqüentemente uma respiração aeróbia prejudicada, levando a uma dependência subsequente sobre o metabolismo glicolítico. No entanto, estudos posteriores têm contestado esta hipótese, referindo que a função mitocondrial não é diminuída, verificando-se que na maioria das neoplasias a fosforilação oxidativa continua e uma quantidade semelhante de ATP é produzida como nas células normais (2, 3, 5, 7-9, 11, 12, 14).

É importante referir que embora a glicólise aeróbica seja o fenótipo metabólico melhor documentado das células tumorais, não é uma característica universal de todos os tumores humanos (8, 9).

Tendo em conta que o metabolismo da glicose em lactato produz apenas 2 moléculas de ATP por cada molécula de glicose e a fosforilação oxidativa produz até 36 moléculas de ATP por oxidação completa desta molécula, levanta-se a questão do porquê da mudança para um metabolismo menos eficiente, pelo menos em termos de produção de ATP, por parte das células em proliferação (2).

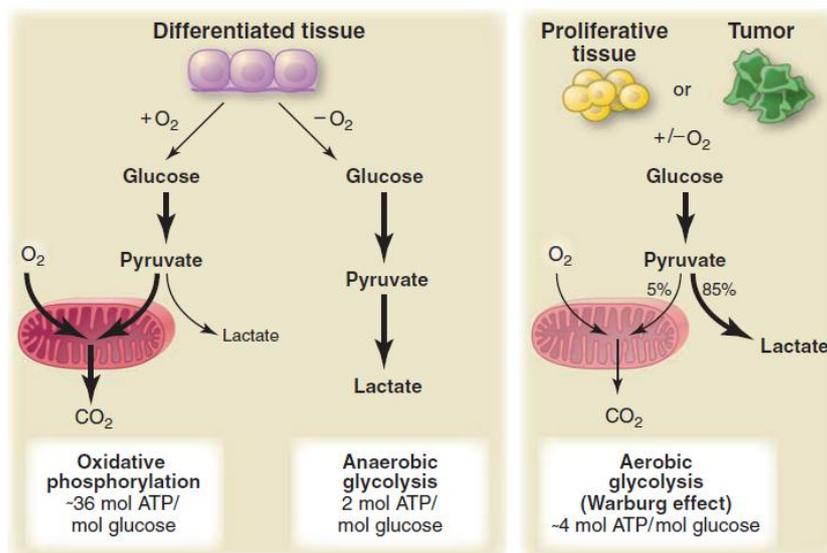


Figura 1 – Representação esquemática das diferenças entre a fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (Efeito de Warburg) (2).

Durante décadas assumiu-se que o efeito de Warburg era provocado pelo facto de se criar um ambiente de hipoxia no tumor, forçando assim as células tumorais a se adaptarem à falta de oxigênio através do aumento da glicólise (2, 8-10, 14). No entanto estas células parecem usar o metabolismo glicolítico antes mesmo da exposição a condições de hipoxia (2, 10). Por exemplo, as células leucémicas são altamente glicolíticas apesar de residirem dentro da corrente sanguínea estando expostas a tensões de oxigênio maiores do que as células na maioria dos tecidos normais (2). Assim, embora a hipoxia que se verifica no tumor é claramente importante para outros aspetos da biologia do cancro, a evidência disponível sugere que é um evento de ocorrência tardia que pode não ser um dos principais contribuintes na mudança para glicólise aeróbica por células tumorais (2, 14).

Em alternativa, uma explicação possível é o facto da produção ineficiente de ATP ser um problema apenas quando os recursos são escassos o que não é o caso das células em proliferação que são expostas a uma fonte contínua de glicose e de outros nutrientes no sangue circulante, permitindo produzir ATP mais rapidamente do que a fosforilação oxidativa de modo a suportar a divisão celular rápida (2, 7, 9, 10, 14).

As vias metabólicas em células com proliferação ativa só recentemente foram estudadas e existem evidências de que o ATP nunca pode ser limitado nestas células e mesmo pequenas perturbações na razão ATP/ADP podem prejudicar o crescimento, já que células deficientes em ATP frequentemente sofrem apoptose (2). Por essa razão, as células tumorais devem escapar aos pontos de controlo que, normalmente, bloqueiam a proliferação sob condições metabólicas de *stress* que são características do microambiente do tumor (9).

Uma segunda explicação proposta para a alteração do metabolismo, é que as células em proliferação têm exigências metabólicas importantes que se estendem para além do ATP (2, 6, 14). Para produzir duas células-filhas viáveis na mitose, uma célula em proliferação deve replicar todo o seu conteúdo celular o que leva a uma grande necessidade de nucleótidos, aminoácidos e lípidos (2, 6). Assim, é geralmente aceite que as células tumorais utilizam intermediários da glicose e do ciclo TCA como percussores na síntese de macromoléculas através de reações anabólicas, por forma a satisfazer as necessidades de crescimento e proliferação celular (2, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 14).

Para a maioria das células de mamíferos em cultura, as únicas duas moléculas metabolizadas em quantidades apreciáveis são a glicose e glutamina. Isto significa que a glicose e glutamina abastecem a maior parte do carbono, azoto, energia livre e redução de equivalentes necessários para permitir o crescimento e a divisão celular verificando-se que as células que convertem a glicose e glutamina em biomassa mais eficientemente irão também proliferar mais rapidamente (2-4, 11). A partir desta perspetiva, torna-se claro que a conversão de toda a glicose em CO₂ via fosforilação oxidativa na mitocôndria para maximizar a produção de ATP vai contra as necessidades da proliferação celular, isto porque alguma glucose deve

ser desviada para precursores macromoleculares, tais como acetil-CoA para a formação de ácidos gordos, intermediários glicolíticos para a formação de aminoácidos não essenciais, e ribose para os nucleótidos (2, 4, 5, 7, 9, 10).

Para a realização de diagnósticos clínicos, o efeito de Warburg pode ser explorado através da aplicação de tomografia por emissão de positrões FDG-PET para detetar tumores malignos e metástases em virtude da sua maior dependência pela glicose em comparação com células normais (4-6, 8-10, 14). FDG-PET utiliza um análogo radioativo da glicose e provou ser altamente eficaz para a identificação e monitorização de muitos tipos de tumores (1, 9).

Uma melhor compreensão acerca das condições metabólicas das células tumorais e das células normais, assim como a forma como o metabolismo de todo o organismo interage com o metabolismo do tumor é necessária para identificar potenciais pontos de intervenção terapêutica (1, 2, 8). Torna-se absolutamente necessário utilizar medidas terapêuticas seletivas, que sejam capazes de atuar seletivamente sobre as células neoplásicas e que não atinjam as células normais, não colocando em causa a sustentabilidade do corpo humano. Ainda relativamente ao modo como o metabolismo de todo o organismo interage com o metabolismo do tumor somos levados a refletir sobre a caquexia. A caquexia associada a neoplasia é exacerbada pelo consumo de nutrientes em excesso por parte do tumor, o que conseqüentemente vai afetar a regulação metabólica de todo o organismo (1, 2). Alguns autores referem um aumento da lipólise no tecido adiposo, assim como da proteólise, da glicólise e da gluconeogénese com incremento do Ciclo de Cori (1, 5). Este ciclo permite reciclar o lactato produzido a partir da glicose, pelas células que proliferam ativamente (1).

Existem alguns compostos capazes de alterar o metabolismo celular como é o caso do sulfureto de hidrogénio (H₂S).

O sulfureto de hidrogénio é um gás transparente, inflamável, incolor e com cheiro forte característico a ovos podres (15-19). Na natureza, é produzido principalmente pela decomposição bacteriana da matéria orgânica e é também encontrado no gás natural, petróleo, e em emissões de enxofre vulcânicas (15, 17).

Até agora, H₂S era reconhecido exclusivamente como um gás tóxico e com risco ambiental (15-17, 19-21). No entanto, o sulfureto é também utilizado como um substrato energético por diversas bactérias foto e quimio-autotróficas (17, 20) e por alguns animais como moluscos, minhocas ou peixes adaptados a ambientes que apresentam elevadas concentrações de sulfureto (22).

Evidências recentes indicam que o H₂S é endogenamente sintetizado por tecidos de mamíferos (17-19) em pequenas quantidades nos vasos sanguíneos através de duas enzimas responsáveis pelo metabolismo da L-cisteína: cistationina β-sintase (CBS) e cistationina γ-liase (CSE) (20, 23, 24) e uma terceira via que envolve a ação combinada de sulfurtransferase

3-mercaptopyruvate (3-MST) e cisteína aminotransferase (CAT) (16, 17, 19, 21, 25), desempenhando assim um papel importante como segundo mensageiro da sinalização celular (19, 20, 23).

As enzimas CBS e CSE são expressos em muitos tecidos, incluindo o rim e fígado. No entanto, no cérebro humano, CBS é o principal produtor de H₂S, enquanto na aorta torácica, artéria ilíaca, veia porta, e útero, CSE é predominante. A enzima 3-MST também é expressa no cérebro, mas a maior parte do H₂S produzido por 3-MST está ligado sob a forma de enxofre sulfano, uma das formas em que H₂S endógeno é armazenado (17).

Além disso, foi demonstrado que H₂S também pode ser sintetizado a partir de substratos endógenos no trato gastrointestinal (17), uma vez que as bactérias presentes no lúmen do cólon constituem uma fonte de sulfureto (16, 19, 22). Este sulfureto deriva do metabolismo bacteriano de aminoácidos e a partir de bactérias anaeróbicas redutoras de enxofre usando iões oxidados, tais como sulfato, como aceitador final de eletrões na respiração mitocondrial (16, 22, 26). As fontes de enxofre são aminoácidos e péptidos que escaparam à absorção na parte superior do trato digestivo, as proteínas de células isoladas a partir do epitélio, mucinas com açúcares sulfatados e iões contendo enxofre, tais como o sulfato ou sulfito (16).

No trato gastrointestinal as concentrações de sulfureto poderiam atingir valores tóxicos que representam uma ameaça para os tecidos de mamíferos circundantes. Contudo, a parede do cólon tem uma grande capacidade para oxidar sulfureto ao nível mitocondrial com base na atividade de sulfureto quinona redutase (SQR), limitando assim a difusão de sulfureto a partir do cólon para todo o organismo (16, 25). Ao mesmo tempo permite a utilização deste substrato mineral como uma fonte bioenergética por parte dos colonócitos (16, 26).

A presença de SQR em muitos tipos diferentes de células e órgãos do organismo mamífero sugere que, de facto, a necessidade de oxidar sulfureto não é restrito ao trato gastrointestinal e que a libertação de sulfureto espontânea pelos tecidos tem de ser verificado, quer para evitar a acumulação de substâncias tóxicas e/ou para controlar a sinalização do sulfureto (19, 25).

O fígado encontra-se numa situação peculiar no que diz respeito ao sulfureto, uma vez que este pode ser visto como uma segunda barreira contra a sua difusão, pois no caso de fuga de sulfureto pela parede do cólon, este seria conduzido primeiro para o fígado através da veia porta. Com efeito, a capacidade das mitocôndrias do fígado para neutralizar o sulfureto parece ser significativa (16, 25).

A principal via de desintoxicação metabólica de sulfureto é a oxidação a sulfato hepática (SO₄²⁻) e subsequente eliminação do sulfato na urina (17, 20). Por outro lado, H₂S também pode ser metilado (CH₃SCH₃) pelo fígado (20). Em circunstâncias normais, o H₂S não se acumula, o que significa que, sob condições fisiológicas, H₂S endógeno não é tóxico para as células (17).

Parece que no cólon, a produção de sulfureto pelas bactérias contribui para os níveis circulantes de H₂S, bem como os níveis de H₂S do tecido do cólon, mas provavelmente não serve como a principal fonte de H₂S para a maioria dos outros tecidos parenquimatosos, presumivelmente devido ao facto de estes tecidos possuírem fontes autónomas significativas de H₂S (16).

O H₂S é uma molécula de sinalização gasosa tal como o óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO), (16, 18, 19, 21, 25) que é altamente solúvel em ambientes aquosos e lípidos, pelo que se difunde facilmente através das membranas das células sem a utilização de transportadores específicos e é rapidamente oxidado (17, 19, 20, 24, 26).

As atividades biológicas do sulfureto de hidrogénio incluem a regulação do tónus vascular, contractilidade do miocárdio, modulação da neurotransmissão e secreção de insulina. Por sua vez, esses efeitos biológicos têm sido atribuídos à ativação dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (17, 20, 23, 24). Os efeitos benéficos tornaram-se óbvios durante a lesão de isquemia/reperfusão do miocárdio, onde o sulfureto protege os tecidos de apoptose e atenua a inflamação (17, 20, 21, 24). Além disso, relativamente á inflamação, ele apresenta quer atividade pró-inflamatória quer anti-inflamatória (20, 21).

Surpreendentemente, os efeitos de H₂S são altamente divergentes, dependendo das suas concentrações locais (16). Muitos dos efeitos observados em baixas concentrações de H₂S são benéficos, por outro lado muitos dos efeitos observados em concentrações elevadas são fisiopatológicos ou toxicológicos. Consoante a sua biodisponibilidade, o sulfureto de hidrogénio é capaz de induzir efeitos opostos sobre a respiração mitocondrial (16, 19, 23, 25).

De facto, a exposição a H₂S em altas concentrações é altamente tóxico para todas as espécies de mamíferos incluindo os seres humanos como é possível verificar por vários acidentes industriais, exposição a substâncias tóxicas de H₂S em pântanos, emissões vulcânicas, e, mais recentemente, o uso de H₂S (produzido pela mistura de reagentes domésticos comuns) como agente de suicídio no Japão (16, 23). A toxicidade do ambiente pelo gás de H₂S é tanto dependente da dose como da duração da exposição. A dose-resposta começa com efeitos locais, tais como irritação conjuntival (a 50 ppm) e de irritação das vias respiratórias superiores (em 100-200 ppm). Com exposições superiores inalatórias verifica-se edema pulmonar (em 250- 500 ppm) e, a concentrações ainda mais elevadas de exposição (500- 1000 ppm) ocorre paralisia respiratória, supressão do SNC e depressão cardiovascular o que pode culminar em morte (16, 17).

A nível molecular, a maior parte da toxicidade do sulfureto de hidrogénio foi principalmente atribuída à inibição do complexo IV mitocondrial (15-17, 19, 20, 22, 24-26).

O complexo IV é o último complexo da cadeia respiratória mitocondrial, sendo designado de citocromo c oxidase (17, 23). É um complexo grande e transmembranar, que tal como os restantes complexos está localizado na membrana interna da mitocôndria, bem como um

componente essencial da respiração celular aeróbia e produção de ATP. A sua função é aceitar os elétrons provenientes das moléculas de citocromo c e transferi-los até ao seu aceitador final, o oxigénio molecular que é convertido em duas moléculas de água, pois além de ser reduzido vai captar H⁺. A nível estrutural, o complexo IV apresenta 14 subunidades proteicas, de entre as quais há a destacar várias proteínas com cofatores metálicos. Concretamente, podemos referir a existência de 2 citocromos com grupos heme, citocromos a e a₃ e dois centros contendo cobre (CuA e CuB). O citocromo a₃ e o centro CuB formam em conjunto o local de redução do oxigénio (16).

O H₂S ao competir com o oxigénio na ligação ao citocromo c oxidase pode inibir a respiração mitocondrial, reduzindo assim o consumo de oxigénio celular (15, 16, 20, 21, 27). Estudos realizados em murganhos conscientes demonstraram que a exposição a gás de sulfureto de hidrogénio resulta em uma inibição reversível do metabolismo celular (15, 28). Blackstone *et al.* relataram que após inalação do gás em concentrações que variam entre 20 a 80 ppm verificou-se uma diminuição na temperatura corporal a 15°C, em conjunto com uma redução da taxa metabólica medida pela redução no consumo de O₂ e produção de CO₂. Os animais ficaram imóveis e a frequência respiratória diminuiu para 10 respirações por minuto. (28) Isto foi chamado de *suspended animation-like state* (16, 20, 21, 27-29). Estas alterações fisiológicas foram comparáveis às observadas em mamíferos com capacidade para hibernar (20, 21, 27). Estes animais podem transitoriamente reprimir processos celulares como resultado de mudanças ambientais desfavoráveis, alterando o seu metabolismo, a seleção do substrato, o consumo de oxigénio, a frequência cardíaca e a temperatura corporal (20).

Após a interrupção da exposição H₂S, os murganhos acordaram, sem apresentar quaisquer défices neurológicos ou comportamentais (20, 21, 23, 28, 29). Outras experiências mostraram que o pré-tratamento com H₂S aumentou a taxa de sobrevivência de murganhos expostos a hipoxia, considerando que a hipoxia conduziu à morte em todos os ratos controlo (30). O grande mistério aqui é que, se o mesmo nível de inibição respiratória fosse induzida por hipoxia, rapidamente causaria a morte do organismo e a morte celular massiva no cérebro, coração e outros tecidos. Isto sugere que o H₂S tem efeitos protetores, independentes da inibição da citocromo-oxidase (23).

Importa referir que o mecanismo exato responsável pela redução do metabolismo celular induzida pelo H₂S ainda não é completamente compreendido (29).

Estas observações sugerem uma possibilidade interessante para o facto de que os efeitos depressores metabólicos de H₂S poderem ser explorados para a proteção de órgãos durante uma doença grave, reduzindo o consumo de O₂ e constituindo uma nova perspetiva terapêutica fascinante para o tratamento de doentes em estado crítico (20, 21, 28, 29).

No entanto, os efeitos do H₂S também foram estudados em animais de grande porte incluindo bovinos e suínos, tendo originado resultados conflitantes, o que pode ser resultado

de diferenças na montagem experimental, incluindo a utilização de diferentes compostos dadores de H_2S , bem como o uso de agentes anestésicos que possam ter influenciado o consumo de oxigénio (20, 21).

É concebível que uma diferença de massa corporal também possa contribuir para essas diferenças, já que devido a uma elevada razão entre superfície/massa, pequenos animais roedores podem reduzir rapidamente a temperatura do corpo, o que pode ser difícil de induzir em mamíferos maiores e seres humanos. Para além de que a inércia térmica em animais de grande porte e humanos podem resistir à diminuição da temperatura corporal (20, 21, 29). Contudo, em várias experiências, o efeito metabólico de H_2S ocorreu dentro de minutos ao passo que uma diminuição da temperatura corporal ocorreu gradualmente ao longo de horas, sugerindo que os efeitos supressores de hibernação no metabolismo são independentes dos efeitos sobre a temperatura do corpo (15). Portanto, uma grande massa corporal pode não impedir a supressão do metabolismo induzida por H_2S (20, 21, 29).

O facto dos seres humanos produzirem H_2S nas paredes dos vasos sanguíneos, como referido anteriormente, pode sugerir que a capacidade de mudar para um substrato alternativo, ou entrar em um estado de metabolismo reduzido com o consumo de oxigénio diminuído, podem estar presentes de forma latente para, naturalmente, diminuir ou parar a fosforilação oxidativa em condições anóxicas. Vários relatos sobre a sobrevivência a repressão circulatória profunda e prolongada, com boa recuperação neurológica, pode apoiar este pensamento, sugerindo que a capacidade de hibernação pode ter persistido durante a evolução dos mamíferos (20, 21).

O uso de um dador de H_2S como o sulfureto de sódio (Na_2S) também tem sido utilizado para reduzir o metabolismo em modelos animais apresentando várias vantagens práticas, nomeadamente a facilidade de administração, ausência da necessidade de um sistema de entrega de inalação, ausência da exposição do gás para a equipa de trabalho e ainda a ausência de problemas relacionados com o odor característico do gás de H_2S (20).

Objetivo

O objetivo deste estudo é verificar se o composto Na_2S apresenta citotoxicidade a nível da viabilidade celular, quando aplicado em culturas de células numa gama de concentrações de 10 a 100 $\mu g/mL$.

Materiais e métodos

Culturas celulares

Para avaliação da citotoxicidade do composto Na₂S foi utilizada a linha celular osteoblástica MG63. As células foram cultivadas em *a-Minimal Essential Medium Eagle* (a-MEM, Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco), 1% (v/v) anfotericina B (250 µg/mL, Gibco) e 1% penicilina/estreptomicina (100 IU/mL penicilina, 2,5 µg/mL estreptomocina, Gibco). As culturas foram incubadas a 37 °C numa atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ e o meio de cultura foi substituído duas vezes por semana. Estas foram mantidas até próximo da confluência e, nesta fase, as células foram libertadas enzimaticamente (solução de 0,04% de tripsina e 0,025% de colagenase; 37°C, 10 min). A densidade celular foi avaliada numa câmara de Neubauer. A suspensão celular foi utilizada para os ensaios de citotoxicidade.

Ensaio de citotoxicidade

As células foram semeadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 10⁴ cells/cm², e cultivadas durante 24h para permitir a adesão celular. De seguida, o meio de cultura foi descartado e substituído por meio de cultura contendo o composto Na₂S nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/mL. As culturas foram mantidas por mais 1 e 4 dias, e caracterizadas relativamente à viabilidade/proliferação celular (ensaio do MTT).

Proliferação/viabilidade celular

A proliferação/viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT que se baseia na redução do sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) pelas células viáveis e determinação espectrofotométrica do produto formado. Em cada dia selecionado para este ensaio, dia 1 e dia 4, após a adição do composto Na₂S, foram adicionados 10 µL de MTT (solução de 5 mg/mL) a cada poço e as células foram incubadas por um período de 3 horas, nas condições acima referidas. O MTT é incorporado pelas células metabolicamente ativas, produzindo cristais de formazan de cor púrpura que se acumulam no citoplasma. No final deste tempo, o meio de cultura foi removido, e as culturas foram fotografadas para visualização dos precipitados de formazan. De seguida, foram adicionados 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO, Panreac) a cada poço. As placas foram agitadas à temperatura

ambiente durante 1 minuto para dissolver os cristais de formazan e, em seguida, a Absorvância das amostras foi lida num leitor ELISA (Synergy HT, BioTek) a $\lambda=550$ nm.

Resultados

Ensaio de toxicidade

A viabilidade/proliferação celular foi avaliada em culturas efetuadas na presença do composto Na_2S após 1 e 4 dias de exposição, Figura 2 e 3. Verificou-se que o composto Na_2S não apresentou citotoxicidade a nível da viabilidade celular e o comportamento celular foi semelhante ao observado nas culturas controlo (ausência do composto Na_2S).

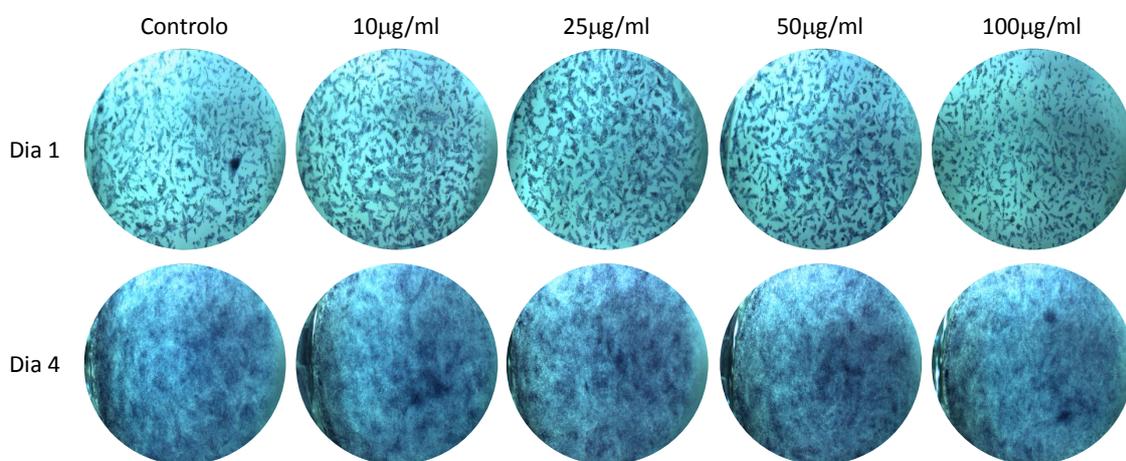


Figura 2 - Viabilidade/proliferação celular avaliada pelo ensaio do MTT. Fotografias dos cristais de formazan formados pela redução do MTT pelas células viáveis. Lupa, 15x.

Tabela I: Média e Desvio Padrão obtidos no dia 1 para as concentrações 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de Na_2S . R1, R2, R3 e R4 representam réplicas independentes do ensaio do MTT.

Dia 1						
$\mu\text{g/mL}$	R1	R2	R3	R4	Média	DevPad
10	0,875	0,82	0,915		0,870	0,048
25	0,793	0,742	0,649	0,583	0,692	0,094
50	0,867	0,956	0,692	0,74	0,814	0,120
100	0,767	0,804	1,082	0,72	0,843	0,163

Tabela II: Média e Desvio Padrão obtidos no dia 4 para as concentrações 10, 25, 50 e 100 µg/mL de Na₂S. R1, R2, R3 e R4 representam réplicas independentes do ensaio do MTT.

Dia 4						
µg/mL	R1	R2	R3	R4	Média	DevPad
10	1,356	1,226	1,363		1,315	0,077
25	1,302	1,26	1,273	1,612	1,362	0,168
50	1,317	1,395	1,404	1,316	1,358	0,048
100	1,095	1,269	1,174	1,462	1,250	0,158

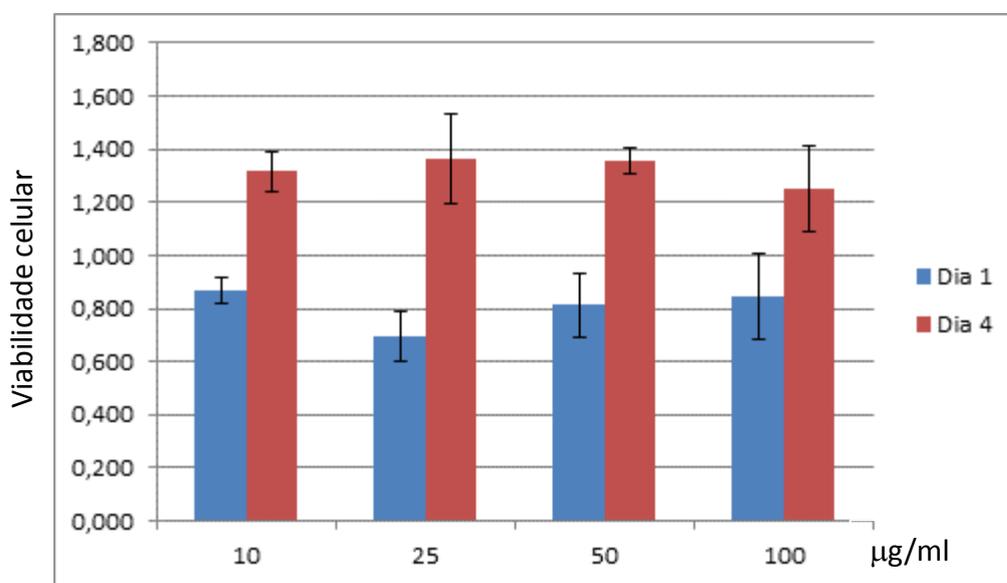


Figura 3 - Avaliação quantitativa após a dissolução dos cristais de formazan formados pela redução do MTT pelas células viáveis.

Como observado na Tabela I, no dia 1 para a concentração de 10 µg/mL de Na₂S obteve-se o valor médio de $0,870 \pm 0,048$. Para a concentração de 25 µg/mL de Na₂S obteve-se o valor médio de $0,692 \pm 0,094$. Para a concentração de 50 µg/mL de Na₂S obteve-se o valor médio de $0,814 \pm 0,120$. Por último, para a concentração de 100 µg/mL de Na₂S obteve-se o valor médio de $0,843 \pm 0,163$.

Como observado na Tabela II, no dia 4 para a concentração de 10 µg/mL de Na₂S obteve-se o valor médio de $1,315 \pm 0,077$. Para a concentração de 25 µg/mL de Na₂S obteve-se o valor médio de $1,362 \pm 0,168$. Para a concentração de 50 µg/mL de Na₂S obteve-se o valor médio de $1,358 \pm 0,048$. Por último, para a concentração de 100 µg/mL de Na₂S obteve-se o valor médio de $1,250 \pm 0,158$.

Discussão

Para a realização deste estudo foi utilizado o composto Na_2S como dador do H_2S , em vez da utilização direta do gás H_2S . Este apresentou várias vantagens práticas como a facilidade de manipulação do composto, ausência de exposição do gás para a equipa de trabalho e de problemas relacionados com o odor característico deste (20). Para além disso, seria muito difícil fazer a incorporação de um gás em culturas celulares.

Como referido anteriormente, com este estudo pretendia-se verificar se o composto Na_2S , numa gama de concentrações de 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, apresentava citotoxicidade quando aplicado em culturas celulares. Esta gama de concentrações utilizada foi definida tendo por base um estudo previamente realizado e publicado por Blackstone *et al.* Contudo, neste estudo foi utilizado o gás H_2S , ao invés da molécula dadora Na_2S . A exposição deste gás em murganhos levou a uma redução da taxa metabólica (28).

Verificou-se que para as concentrações testadas, o composto Na_2S não apresentou citotoxicidade a nível da viabilidade celular, como observado na análise qualitativa e quantitativa do ensaio de redução do MTT. As células proliferam ao longo do tempo de cultura, apresentando uma elevada taxa de crescimento (31).

Através da análise dos resultados, é possível concluir que quer ao dia 1 quer ao dia 4 não parece ter havido diferenças estatísticas nos valores de absorvância do composto MTT, o que indica que as concentrações do Na_2S não foram citotóxicas para a linha celular osteoblástica MG63. (Figura 3)

Por outro lado, comparando o dia 1 com o dia 4 houve um aumento significativo/considerável da viabilidade/proliferação, indicando que as células continuam a proliferar sob ação do composto Na_2S . (Figura 3) No entanto, este aumento do número de células ao dia 4 poderá ter ocorrido devido a um aumento do tempo de exposição bem como uma diminuição da concentração do composto Na_2S desde o dia 1 até ao dia 4, uma vez que a sua ação é reversível. De facto, foi demonstrado que após a interrupção da exposição do gás de H_2S , os murganhos não apresentaram qualquer alteração (28).

Seria importante no futuro testar este composto noutras linhas celulares e noutras concentrações dado que no corpo humano existem diferentes tecidos e células submetidas a diferentes condições.

Conclusão

De acordo com o estudo efetuado concluiu-se que para a gama de concentrações utilizada, o composto Na_2S (molécula dadora de H_2S) não apresenta citotoxicidade a nível da viabilidade celular.

É importante referir que se trata de um estudo preliminar pelo que a escolha da linha celular para a sua realização não foi feita com o maior rigor. Por esse motivo, temos como perspetivas futuras a continuação deste trabalho com o objetivo de testar este composto em linhas celulares mais específicas e noutras concentrações, assim como perceber se este tem a capacidade de inibir a respiração mitocondrial, resultando conseqüentemente numa redução do metabolismo celular.

Neste sentido, o composto Na_2S poderá ter, no futuro, um papel importante em termos terapêuticos.

Agradecimentos

Quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Helena Fernandes por toda a ajuda e colaboração.

Ao meu coorientador, Professor Doutor António Silvério Cabrita por todos os conselhos, disponibilidade e colaboração nesta etapa importante da minha vida académica. Agradeço ainda todos os conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

Ao Mestre Dr. Eduardo Costa pela disponibilidade e apoio na interpretação dos dados.

Aos meus colegas de curso que estiveram sempre disponíveis para me apoiar em todos os momentos.

Às minhas amigas Soraia Correia, Alexandra Freitas, Raquel Botelho, Joana Matos e Mélodi Guedes por tudo aquilo que vivemos ao longo destes anos, por todo o apoio, conselhos e paciência... muito obrigada, sem vocês não teria sido possível.

Não posso deixar de agradecer ao Pedro Tiago por ter estado sempre presente quando mais precisei.

Por último um agradecimento muito especial à minha família. Aos meus avós por toda a dedicação, carinho e apoio incondicional. À minha mãe pela força, confiança e coragem que me transmite todos os dias e por ter sempre a palavra certa no momento certo. Ao meu irmão por todas as gargalhadas e momentos de descontração que me proporciona.

Bibliografia

1. Ferreira LM. Cancer metabolism: the Warburg effect today. *Experimental and molecular pathology*. 2010;89(3):372-80.
2. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, NY)*. 2009;324(5930):1029-33.
3. Alam MM, Lal S, FitzGerald KE, Zhang L. A holistic view of cancer bioenergetics: mitochondrial function and respiration play fundamental roles in the development and progression of diverse tumors. *Clinical and translational medicine*. 2016;5(1):3.
4. Dell' Antone P. Energy metabolism in cancer cells: how to explain the Warburg and Crabtree effects? *Medical hypotheses*. 2012;79(3):388-92.
5. Icard P, Lincet H. A global view of the biochemical pathways involved in the regulation of the metabolism of cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1826(2):423-33.
6. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-7.
7. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*. 2008;7(1):11-20.
8. Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(6):568-76.
9. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(2):85-95.
10. Aminzadeh S, Vidali S, Sperl W, Kofler B, Feichtinger RG. Energy metabolism in neuroblastoma and Wilms tumor. *Translational pediatrics*. 2015;4(1):20-32.
11. Kim A. Mitochondria in Cancer Energy Metabolism: Culprits or Bystanders? *Toxicological research*. 2015;31(4):323-30.
12. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese JG, Philippov PP, Werner J, et al. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *Journal of cellular physiology*. 2016.
13. Gottlieb E, Tomlinson IP. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(11):857-66.
14. Upadhyay M, Samal J, Kandpal M, Singh OV, Vivekanandan P. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;137(3):318-30.

15. Volpato GP, Searles R, Yu B, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Ichinose F, et al. Inhaled hydrogen sulfide: a rapidly reversible inhibitor of cardiac and metabolic function in the mouse. *Anesthesiology*. 2008;108(4):659-68.
16. Szabo C, Ransy C, Modis K, Andriamihaja M, Murghes B, Coletta C, et al. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. *British journal of pharmacology*. 2014;171(8):2099-122.
17. Guo W, Kan JT, Cheng ZY, Chen JF, Shen YQ, Xu J, et al. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012;2012:878052.
18. Shi HQ, Zhang Y, Cheng MH, Fan BS, Tian JS, Yu JG, et al. Sodium Sulfide, a Hydrogen Sulfide-Releasing Molecule, Attenuates Acute Cerebral Ischemia in Rats. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2016;22(7):625-32.
19. Vicente JB, Malagrino F, Arese M, Forte E, Sarti P, Giuffre A. Bioenergetic relevance of hydrogen sulfide and the interplay between gasotransmitters at human cystathionine beta-synthase. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1857(8):1127-38.
20. Aslami H, Schultz MJ, Juffermans NP. Potential applications of hydrogen sulfide-induced suspended animation. *Current medicinal chemistry*. 2009;16(10):1295-303.
21. Aslami H, Juffermans NP. Induction of a hypometabolic state during critical illness - a new concept in the ICU? *The Netherlands journal of medicine*. 2010;68(5):190-8.
22. Gubern M, Andriamihaja M, Nubel T, Blachier F, Bouillaud F. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(8):1699-706.
23. Cooper CE, Brown GC. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2008;40(5):533-9.
24. Hildebrandt TM. Modulation of sulfide oxidation and toxicity in rat mitochondria by dehydroascorbic acid. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1807(9):1206-13.
25. Helmy N, Prip-Buus C, Vons C, Lenoir V, Abou-Hamdan A, Guedouari-Bounihi H, et al. Oxidation of hydrogen sulfide by human liver mitochondria. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2014;41:105-12.
26. Lagoutte E, Mimoun S, Andriamihaja M, Chaumontet C, Blachier F, Bouillaud F. Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1797(8):1500-11.
27. Aslami H, Heinen A, Roelofs JJ, Zuurbier CJ, Schultz MJ, Juffermans NP. Suspended animation inducer hydrogen sulfide is protective in an in vivo model of ventilator-induced lung injury. *Intensive care medicine*. 2010;36(11):1946-52.

28. Blackstone E, Morrison M, Roth MB. H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science (New York, NY)*. 2005;308(5721):518.
29. Asfar P, Calzia E, Radermacher P. Is pharmacological, H₂S-induced 'suspended animation' feasible in the ICU? *Critical care (London, England)*. 2014;18(2):215.
30. Blackstone E, Roth MB. Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. *Shock (Augusta, Ga)*. 2007;27(4):370-2.
31. Simon F, Giudici R, Duy CN, Schelzig H, Oter S, Groger M, et al. Hemodynamic and metabolic effects of hydrogen sulfide during porcine ischemia/reperfusion injury. *Shock (Augusta, Ga)*. 2008;30(4):359-64.